

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets⁵ : C07H 21/00		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 92/00315 (43) Date de publication internationale: 9 janvier 1992 (09.01.92)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR91/00503		(74) Mandataire: WARCOIN, Jacques; Cabinet Reginbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).	
(22) Date de dépôt international: 24 juin 1991 (24.06.91)		(81) Etats désignés: AT (brevet européen), BE (brevet européen), CA, CH (brevet européen), DE (brevet européen), DK (brevet européen), ES (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), GR (brevet européen), IT (brevet européen), JP, LU (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US.	
(30) Données relatives à la priorité: 90/08008 26 juin 1990 (26.06.90) FR		(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 15, quai Anatole-France, F-75007 Paris (FR).	
(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : IMBACH, Jean-Louis [FR/FR]; Clos des Oliviers, 1108, rue de Las-Sorbes, F-34000 Montpellier (FR). RAYNER, Bernard [FR/FR]; Résidence "Chênes-Colombières", Bât. G, 180, avenue de l'Occitanie, F-34100 Montpellier (FR). VASSEUR, Jean-Jacques [FR/FR]; Place E. Bataillon, F-34095 Montpellier Cédex 5 (FR).		Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>	
(54) Title: OLIGONUCLEOTIDE FUNCTIONALIZATION METHOD			
(54) Titre: PROCEDE DE FONCTIONNALISATION D'UN OLIGONUCLEOTIDE			
(57) Abstract			
A method for functionalizing an oligonucleotide at its 5'OH end by means of an amine effector agent having formula RNH ₂ . According to the method, (a) said oligonucleotide is synthesized, (b) a dideoxynucleotide is attached by its 5' end to the 5'OH end of said oligonucleotide, and (c) said oligonucleotide is covalently coupled with the RNH ₂ amine reagent by means of a reducing amination reaction between said amine reagent and an aldehyde function at the 5'OH end of the oligonucleotide originating from the opening by acid hydrolysis of the glycoside ring of the dideoxynucleotide at the 5'OH end of said oligonucleotide.			
(57) Abrégé			
La présente invention a pour objet un procédé de fonctionnalisation d'un oligonucléotide en son extrémité 5'OH par un agent effecteur aminé de formule RNH ₂ caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes: (a) on synthétise ledit oligonucléotide, (b) on assemble sur l'extrémité 5'OH dudit oligonucléotide, un didésoxynucléotide via l'extrémité 5' de ce dernier, (c) on effectue un couplage covalent dudit oligonucléotide avec ledit réactif aminé RNH ₂ par une réaction d'amination réductrice entre ledit réactif aminé et une fonction aldéhyde à l'extrémité 5'OH de l'oligonucléotide provenant de l'ouverture par hydrolyse acide du cycle glycosidique du didésoxynucléotide à l'extrémité 5'OH dudit oligonucléotide.			

Best Available Copy

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	ES	Espagne	MG	Madagascar
AU	Australie	FI	Finlande	ML	Mali
BB	Barbade	FR	France	MN	Mongolie
BE	Belgique	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BF	Burkina Faso	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BG	Bulgarie	GN	Guinée	NL	Pays-Bas
BJ	Bénin	GR	Grèce	NO	Norvège
BR	Brésil	HU	Hongrie	PL	Pologne
CA	Canada	IT	Italie	RO	Roumanie
CF	République Centrafricaine	JP	Japon	SD	Soudan
CG	Congo	KP	République populaire démocratique de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KR	République de Corée	SN	Sénégal
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SU	Union soviétique
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark				

PROCEDE DE FONCTIONNALISATION D'UN OLIGONUCLEOTIDE

La présente invention concerne le procédé de fonctionnalisation d'un oligonucléotide en son extrémité 5'OH par un agent effecteur aminé. La présente invention concerne également un synthon utile dans le procédé consistant en un dérivé phosphoramidite de didesoxynucléoside.

5 La synthèse d'oligonucléotides liés de façon covalente à divers agents effecteurs présente un intérêt considérable de par l'usage massif en biochimie et en biologie moléculaire de ces molécules et leur utilisation en tant qu'agents thérapeutiques potentiels.

10 En particulier, il a été montré que la fixation d'un agent intercalant sur un oligonucléotide accroît la stabilité des duplexes formés avec la séquence complémentaire de ces oligomères (U. Asseline et col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 3297-3301, 1984) et améliore la pénétration de ces derniers à travers les membranes cellulaires (P. Verspieren et col., Gene, 61, 307-315, 1987).

15 D'autre part, des oligonucléotides liés à des groupements fluorescents ou à la biotine (S. Agrawal, C. Christodoulou et M. J. Gait, Nucleic Acids Res., 14, 6227-6245, 1986 ; P. Richterich, Nucleic Acids Res., 17, 2181-2185, 1989) peuvent être aisément détectés respectivement par des méthodes fluorométriques ou enzymatiques et colorimétriques très sensibles. Ces composés peuvent être utilisés comme sondes moléculaires froides et remplacer avantageusement les sondes radioactives.

20 Enfin, des oligonucléotides liés à des groupements réactifs pouvant être activés chimiquement (C. B. Chen et D. S. Sigman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 7147-7151 ; T. Le Doan et col., Nucleic Acids Res., 15, 8643-8659, 1987 ; J. C. François et col., Biochemistry, 27, 2272-2276, 1988 ; 25 S. A. Strobel, H. E. Moser et P. B. Dervan, J. Am. Chem. Soc., 110, 7927-7929, 1988 ; S.B. Lin et col., Biochemistry, 28, 1054-1061, 1989) ou photochimiquement (T. Le Doan et col., Nucleic Acids Res., 15, 7749-7760, 1987) sont susceptibles de se fixer sur des acides nucléiques au niveau de 30 séquences complémentaires et d'induire localement des dommages irréversibles. Cette famille de composés peut être utilisée pour inhiber sélectivement les fonctions biologiques d'un gène déterminé. La séquence de l'oligomère a pour fonction d'assurer la spécificité de reconnaissance au niveau de la séquence complémentaire portée par le gène ; l'effecteur chimique assurant alors des dommages sur cette cible.

Dans la présente demande de brevet, on entend par "oligonucléotide" aussi bien des oligodésoxynucléotides c'est-à-dire en série ADN que des oligoribonucléotides c'est-à-dire en série ARN. D'autre part, on entend également par "oligonucléotide" des oligonucléotides à configuration anomérique bêta ou à configuration anomérique non naturelle alpha.

Enfin, les nucléotides constituant l'oligonucléotide peuvent être des nucléotides vrais c'est-à-dire avec un phosphate en 5' du nucléoside correspondant ou des dérivés, entre autres, du type phosphorothiorate, méthylphosphonate, comme il sera vu plus loin.

La demanderesse a déjà décrit dans d'autres demandes de brevet des procédés de fonctionnalisation d'un oligonucléotide en son extrémité 5'OH par un agent effecteur aminé. Ainsi pour la meilleure intelligence de la présente invention, on se reportera utilement aux demandes de brevet FR 83 01 223 (2 540 122) et FR 84 117 955 (2 568 254) dans lesquelles ont été décrits des composés chimiques constitués par un oligonucléotide comportant un enchaînement de nucléotides naturels, à anomérie bêta éventuellement modifiés, sur lequel se trouve fixé par une liaison covalente au moins un groupe intercalant.

Dans FR 87 03 366 (2 586 707) on a décrit la synthèse de composés oligonucléotidiques liés à un groupe chimique activable, leur application à titre de nucléases artificielles spécifiques de séquences.

Dans la demande de brevet International PCT WO 83/01 451 a été décrite une méthode dans lequel l'oligonucléotide est stabilisé sous forme de phosphotriester.

Dans le brevet Américain US 4 469 863 sont décrits des oligonucléotides qui sont stabilisés par remplacement des liaisons phosphodiesters naturelles par des liaisons phophonates.

Dans la demande internationale PCT WO 88/04 301, on a décrit la préparation d'oligonucléotides à anomérie alpha ainsi que leur couplage à un agent intercalant ou à un groupement activable chimiquement ou photochimiquement.

Dans la présente demande, on entend par "agent effecteur", un radical correspondant à un agent d'intercalation encore appelé agent intercalant, ou un radical chimique ou photostabilisable tel qu'un radical

porteur d'une fonction réagissant directement ou indirectement avec les chaînes de nucléotides ou un radical dont la présence permet une détection facile et sensible.

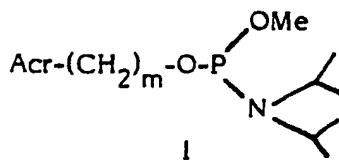
5 Dans la demande de brevet FR 87 04 339, on a décrit des synthèses par la méthode au phosphoramidite sur support solide pour préparer des composés oligodésoxyribonucléotides alpha et dans la demande de brevet FR 88 12 264, on a décrit des synthèses par la méthode au phosphoramidite sur support solide, de composés oligoribonucléotides alpha.

10 Jusqu'à présent, dans les procédés de fonctionnalisation d'un oligonucléotide par un agent effecteur, on utilise lors de la dernière étape de l'elongation de l'oligonucléotide, un dérivé par exemple phosphoramidite dans le cas d'une synthèse sur support solide au phosphoramidite dudit agent effecteur fonctionnalisé par un linker. Ainsi, l'article de Stein et al
15 Géne 72 (1988) 333-341 se rapporte à une méthode de fonctionnalisation classique d'un oligonucléotide, il s'agit dans ce cas de l'acridine (ACr).

On peut décomposer cette méthode comme suit :

- a) Fonctionnalisation de l'acridine par le linker ($m = 3$ ou 5)
- b) Formation du phosphoramidite correspondant.

20



25

c) Synthèse sur support solide en utilisant l lors de la dernière étape de l'elongation sur machine.

d) Décrochage du support solide, et déprotection de l'oligomère avec $\text{C}_6\text{H}_5\text{SH}$. On observe, dans ces conditions, une réaction parasite sur l'acridine de l'oligomère final lors de la déprotection (Cl est remplacé par $\text{C}_6\text{H}_5\text{S}$).

L'approche décrite dans cet article nécessite, à chaque fois que l'on veut introduire un effecteur différent, de synthétiser le phosphoroamidite correspondant :

5

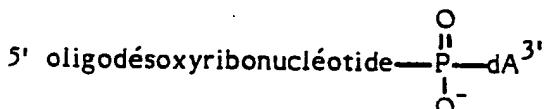


10

15

Pour pallier à cet inconvénient, on a cherché à coupler de façon covalente un oligodésoxyribonucléotide avec un réactif aminé ($R-NH_2$) à son extrémité 3'OH par une réaction d'amination réductrice entre le dérivé aminé et la fonction aldéhydique d'un site abasique (AP) généré dans l'oligonucléotide (J.-J. Vasseur, C. Gauthier, B. Rayner, J. Paoletti et J. -L. Imbach, Biochem. Biophys. Res. Commun., 152, 56-61, 1988 ; J. -R. Bertrand, J. -J. Vasseur, A. Gouyette, B. Rayner, J.-L. Imbach, C. Paoletti et C. Malvy, J. Biol. Chem., 264, 14172-17178, 1989) selon le schéma suivant :

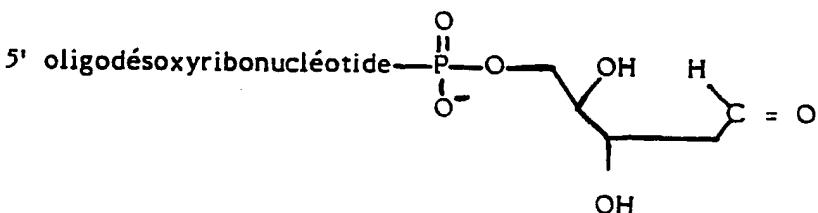
20



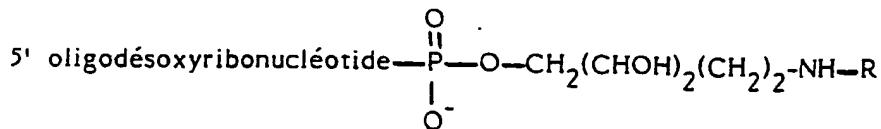
25

HCl ↓
création d'un site AP (en milieu de chaîne)
ou comme ici à l'extrémité 3' de l'oligomère

30



$R-NH_2$, $NaBH_3CN$



5

Cette approche très générale, en elle-même puisque de nombreux effecteurs R-NH₂ peuvent être considérés, est toutefois limitée par la création du site AP (2' -désoxyribose).

10

En effet, celui-ci est obtenu par hydrolyse acide de la liaison glycosidique d'une désoxyadénosine (dA).

15

La chaîne oligonucléotidique ne peut alors contenir que des nucléosides pyrimidiniques compte tenu du fait que dC et dT sont beaucoup moins sensibles à l'hydrolyse acide que dA ou dG. En d'autres termes, il n'est donc possible par cette méthode de fonctionnaliser par des effecteurs aminés des oligodésoxyribonucléotides constitués uniquement de nucléosides pyrimidiniques.

20

La présente invention propose un procédé général de formation d'un site abasique à l'extrémité 5'OH d'un oligonucléotide (tant en série ADN qu'en série ARN) synthétisé sur support solide et comprenant cette fois-ci le cas échéant toutes les bases usuelles (A, C, G, T ou U) de l'ADN et de l'ARN ainsi que les bases modifiées. Ce procédé original permet ainsi de fonctionnaliser des oligonucléotides de séquences quelconques par des effecteurs aminés.

25

La méthode de fonctionnalisation selon l'invention, a pour caractéristique essentielle l'utilisation de didésoxyribonucléosides et permet via la synthèse automatisée sur support solide de fonctionnaliser des oligonucléotides de séquences quelconques à leur extrémité 5'OH.

30

Le procédé selon l'invention est applicable aux séries ADN ou ARN quelles que soient les modifications structurelles apportées aux oligomères (séries naturelles de configuration bêta, séries non naturelles de configuration alpha, phosphorothioates, méthylphosphonates, etc...).

Plus précisément la présente invention a pour objet un procédé de fonctionnalisation d'un oligonucléotide en son extrémité 5'OH par un agent effecteur aminé de formule RNH_2 caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes :

- 5 a) on synthétise ledit oligonucléotide
- b) on assemble sur l'extrémité 5'OH dudit oligonucléotide, un didésoxynucléotide via l'extrémité 5' de ce dernier,
- 10 c) on effectue un couplage covalent dudit oligonucléotide avec ledit réactif aminé RNH_2 par une réaction d'amination réductrice entre ledit réactif aminé et une fonction aldéhyde à l'extrémité 5'OH de l'oligonucléotide provenant de l'ouverture par hydrolyse acide du cycle glycosidique du didésoxynucléotide à l'extrémité 5'OH dudit oligonucléotide.

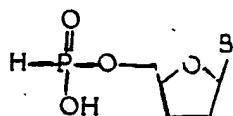
15 La présente invention fournit donc une nouvelle approche de formation d'un site abasique didésoxyribose à l'extrémité 5'OH d'un oligomère pouvant contenir des bases quelconques et ceci quelle que soit la série oligonucléotidique considérée (naturelle ou modifiée). Ces oligonucléotides abasiques ne sont pas isolés car ils conduisent aisément et de façon quantitative à leur forme dérivatisée après amination réductrice avec des effecteurs aminés.

20 Dans un mode de réalisation du procédé selon l'invention aux étapes a) et b), la synthèse de l'oligonucléotide est une synthèse d'assemblage au phosphoramidite sur support solide dans la dernière étape de laquelle, on utilise un dérivé phosphoramidite en 5' du didésoxy-nucléoside correspondant au didésoxynucléotide que l'on assemble par un cycle de synthèse supplémentaire à l'extrémité 5' dudit oligonucléotide.

25 Il apparaît que les dérivés phosphoramidites de didésoxy-nucléosides selon l'invention sont beaucoup plus sensibles à l'hydrolyse acide que les didésoxyribonucléosides ou les ribonucléosides correspondant. Parmi ceux-ci, comme ce sera vu plus loin, les dérivés didésoxynucléosides de la nébularine s'hydrolysent plus aisément.

Toutefois, il en va de même d'autres dérivés de didésoxy-nucléosides, notamment, des dérivés hydrogéno-phosphonates correspondants de formule :

5



ce qui ouvre la possibilité d'avoir recours à d'autres types de synthèses que
10 la synthèse au phosphoramidite et en particulier aux synthèses à l'aide de dérivés hydrogéne-phosphonates (Nucleic Acids Researchs Vol. 14 N° 13 1988).

Un procédé en phase solide selon la méthode au phosphoramidite, comporte les étapes essentielles suivantes :

15 - On immobilise un dérivé nucléoside protégé en 5', par l'intermédiaire d'une de ses fonctions hydroxyle en 2' ou 3' sur un support solide,

20 - On assemble sur ce support dans un réacteur synthétiseur manuel ou automatique la chaîne d'oligobonucléotide protégée par condensation de monomères constitués de nucléosides protégés en 5' et 2' et substitués par des groupes phosphoramidites en 3',

- Les oligonucléotides sont obtenus après décrochage du support de l'oligomère obtenu et élimination des groupes protecteurs.

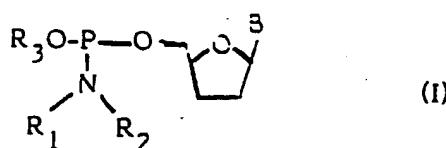
25 De façon appropriée, l'assemblage de l'oligonucléotide se fait par condensation, en présence d'un agent activateur, desdits monomères entre leur fonction en 3' et la fonction hydroxyle-5' du composé nucléoside immobilisé pour le premier monomère ou d'un composé intermédiaire polynucléotide protégé fixé sur ledit composé nucléoside immobilisé pour les monomères suivants.

30 Notamment, l'agent activateur pour la condensation desdits monomères peut être choisi parmi le tétrazole et ses dérivés, tels que le paranitro-phényl tétrazole.

Dans le procédé selon l'invention, de préférence après les étapes a) et b) et avant l'étape c) on décroche du support solide le composé constitué par ledit oligonucléotide à l'extrémité 5' duquel est assemblé le dit didésoxynucléotide et on élimine les groupes protecteurs.

La réaction d'amination réductrice à l'étape c) peut se faire par exemple par un traitement au cyanoborohyrure de sodium en milieu acide.

Dans un mode de réalisation du procédé selon une synthèse de phosphoramidite, utilisera le dérivé phosphoramidite de didésoxynucléoside de formule :



formule dans laquelle :

- R₁ et R₂ représentent un alkyl en C₁ à C₇ éventuellement substitué, tel que CH₃, CH-(CH₃)₂ ou R₁ + R₂ forment ensemble un groupe morpholino



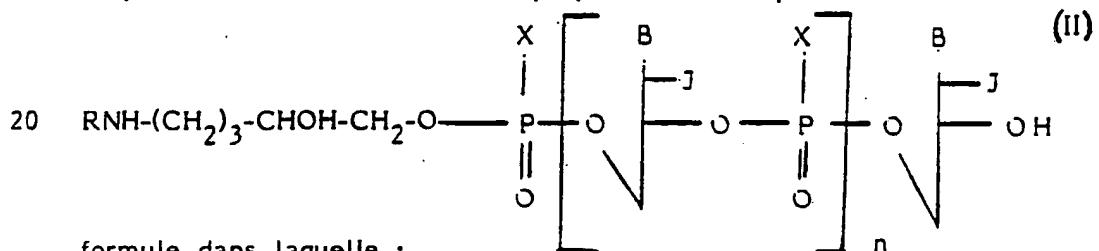
- R₃ représente un alkyl en C₁ à C₇ éventuellement substitué notamment CH₃ ou CH₂-CH₂CN

- B représente une base d'acide nucléique notamment, l'adénine, la guanine ou la nébularine.

S'agissant de la base d'acide nucléique B, on choisit en effet de préférence, l'adénine, la guanine ou la nébularine compte tenu de leur facilité d'hydrolyse acide, par rapport aux autres bases d'acides nucléiques. De préférence encore, on utilisera un dérivé phosphoramidite de formule I dans laquelle B représente la nébularine.

L'originalité et l'intérêt de l'approche selon l'invention réside en l'utilisation lors de la dernière étape de la synthèse oligonucléotidique sur support solide d'un même dérivé phosphoramidite de didésoxynucléoside quel que soit l'agent effecteur que l'on souhaite introduire. Le dérivé phosphoramidite de didésoxynucléoside, après ouverture du cycle désoxy-sucre, apporte le "linker" entre l'oligonucléotide proprement dit et l'agent effecteur. En outre, la déprotection ne s'effectue plus selon l'invention sur l'oligomère fonctionnalisé avec des risques de réaction parasite, mais l'oligomère est déprotégé avant l'introduction de l'effecteur. La consommation en agent effecteur, substance en général assez chère, est donc moindre dans un procédé selon l'invention car introduit à la dernière étape de la synthèse. Dans les réalisations antérieures telles que l'article de Stein et al, la préparation du phosphoramidite nécessitait l'introduction préalable du linker avec nécessité d'utiliser lors de la synthèse en phase solide un excès (20 fois la stoéchiométrie du dérivé phosphoramidite).

Dans un mode de réalisation particulier, il est possible selon le procédé selon l'invention de préparer des composés de formule :



formule dans laquelle :

- R_nH est le reste monovalent de l'agent effecteur aminé R_nH₂,
25 - J = H ou OH

- les radicaux B peuvent être identiques ou différents entre eux et représentent chacun une base d'un acide nucléique éventuellement modifiée attachée au cycle glycosidique selon une configuration anomérique alpha ou
30 bêta,
- les radicaux X peuvent être identiques ou différents entre eux et représentent un oxoanion O⁻, un thioanion S⁻, un groupe alkyle, un groupe alcoxy, aryloxy, un groupe aminoalkyle, aminoalcoxy, thioalkyle,
- n est compris entre 1 et 50.

On citera plus particulièrement les composés de formule II dans laquelle

5 X = O⁻, S⁻, ou CH₃.

Lorsque X = S⁻, l'étape usuelle d'oxydation après la détritylation, l'addition et le capping peut être remplacée par un cycle de sulfurisation (GENE 72 343-347) (W.J. Stec, G. Zon, W. Egan et B. Stec, J. Amer. Chem. Soc., 106, 6077-6079, 1984 ; R.P. Iyer, W. Egan, J.B. Regan et 10 S.L. Beaucage, J. Amer. Chem. Soc. 112, 1253-1254, 1990). Lorsque X = CH₃, un synthon 5'-(dimethoxytrityl) nucléoside 3'-(N,N-diisopropylméthylphosphonamidite) peut être utilisé en lieu et place d'un synthon phosphoramidite, lors de l'étape d'addition (M.A. Dorman, S.A. Noble, L.J. McBride et M.H. Caruthers, Tetrahedron, 40, 95-102, 1984 ; A. Jäger et J. 15 Engels, Tetrahedron Letters, 25, 1437-1440, 1984).

Comme on l'a déjà mentionné, les radicaux effecteurs de formule RNH⁻ selon l'invention correspondent à des agents effecteurs qui sont des composés connus dans les techniques touchant aux acides nucléiques. Il s'agit par exemple des composés capables de "s'intercaler" 20 dans la structure des ADN ou des ARN.

Ces agents d'intercalation sont, en général, constitués par des composés polycycliques ayant une configuration plane tels que l'acridine, la furocoumarine, la daunomycine, la 1,10-phénanthroline, la phénanthridinium, les prophyrines, les dérivés de la dipyrido (1,2-a : 3', 2'-d) imidazole, 25 l'ellipticine ou l'ellipticinium ou leurs dérivés comportant une fonction NH₂.

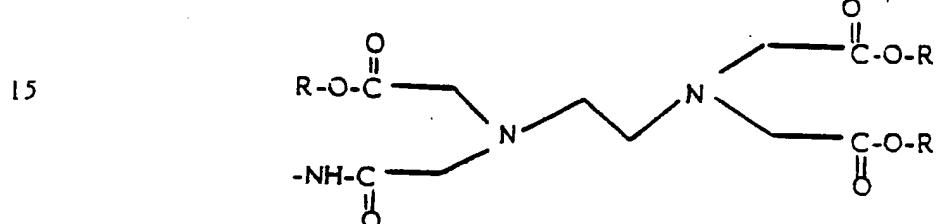
Ces agents effecteurs peuvent aussi être des radicaux chimiques réactifs tels que des radicaux chimiques de scission c'est-à-dire que ces radicaux peuvent directement ou indirectement réagir pour scinder une chaîne de nucléotides. De préférence, ces radicaux chimiques réactifs seront activables, par exemple par voie chimique ou photochimique. Les groupes réactifs de scission activables sont, par exemple, des dérivés de composés tels que :

l'acide éthylène-diamine-tétracétique,

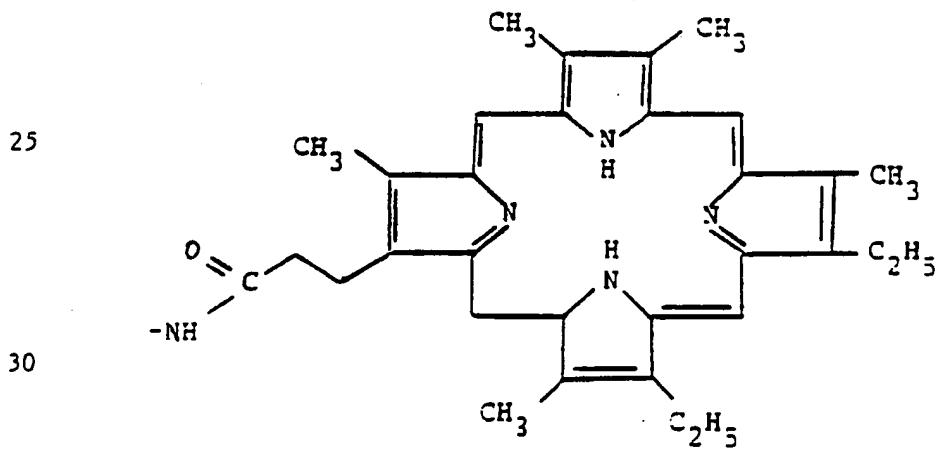
l'acide diéthylène-triamine-pentaacétique,
les porphyrines,
la 1,10-phénanthroline. le psoralène et autres groupes
5 aromatiques absorbant les radiations du proche U.V. et du visible.

Ces groupements chimiquement activables en présence d'ions métalliques, d'oxygène et d'un agent réducteur, induisent des coupures dans des séquences d'acides nucléiques situées dans leur voisinage.

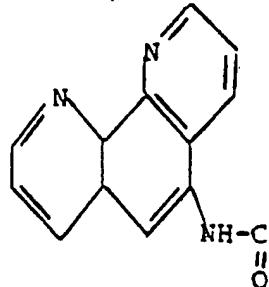
- Plus précisément selon la présente invention le reste RNH de
10 l'agent effecteur peut représenter :
- les radicaux dérivés de l'acide éthylène-diamine-tétraacétique de formule :



- 20 - les radicaux dérivés de l'acide d'éthylène-triamine-pentaacétique,
- les radicaux dérivés de la méthylpyrroporphyrine de formule :

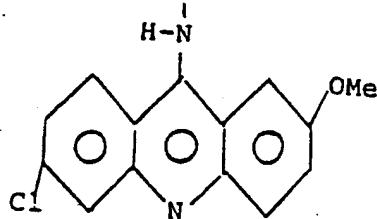


- les radicaux dérivés de la phénanthroliune de formule :



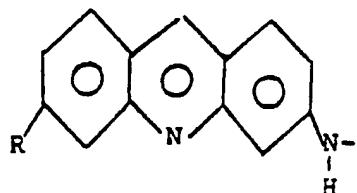
- les radicaux dérivés de l'acridine

5



- les radicaux dérivés de la proflavine

10

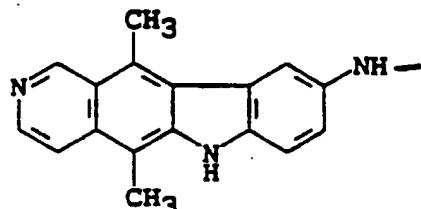


15

R_1 représentant un groupement amino (NH_2) ou azido (N_3^-)

- la 9 amino ellipticine =

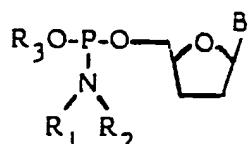
20



25

Enfin la présente invention a pour objet un synthon utile dans
un procédé selon l'invention caractérisé en ce qu'il répond à la formule
générale :

30



formule dans laquelle R_1 , R_2 , R_3 et B ont les significations données dans la revendication 4.

Comme déjà mentionné, de préférence dans le synthon selon l'invention, B représente de préférence l'adénine, la guanine ou la nébularine.

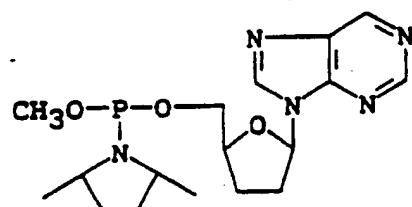
5 D'autres avantages et caractéristiques de la présente invention apparaîtront à la lumière des exemples qui vont suivre :

10

EXEMPLE 1 : Utilisation de phosphoramidite de didesoxy-nucléoside en vue de créer un site abasique (résidu 2', 3' didesoxypyribose en 5' d'un oligonucléotide destiné à être fonctionnalisé).

15

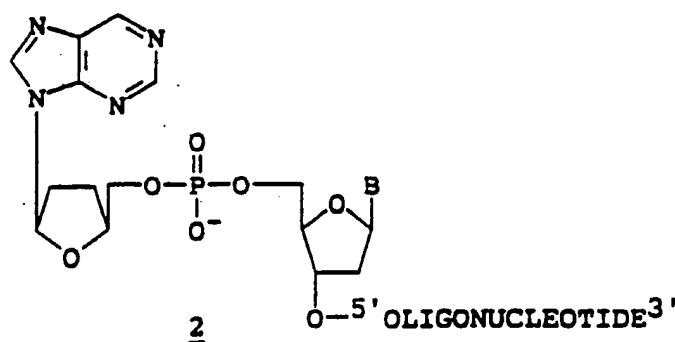
On a préparé le phosphoramidite de formule :

20
1

25

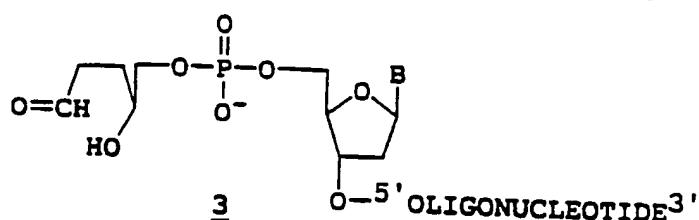
Après assemblage complet de l'oligonucléotide désiré sur le synthétiseur un cycle supplémentaire est effectué qui permet d'incorporer le phosphoramidite 1.

30



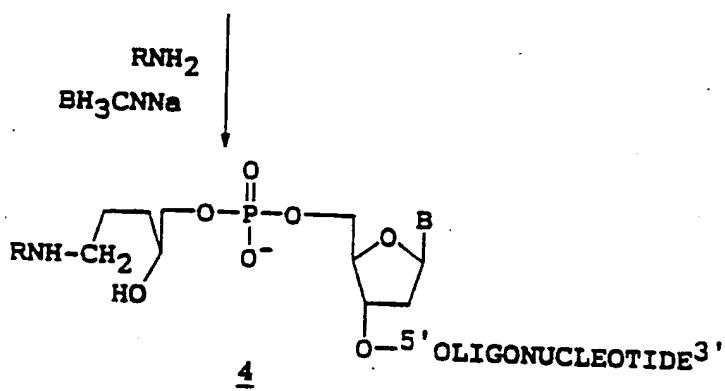
5 L'oligomère correspondant 2 est obtenu après déprotection selon les méthodes usuelles puis éventuellement purifié par CLHP. Un traitement en milieu acide (30 mM HCl, 37°, 12 à 15 min) conduit à l'hydrolyse sélective du résidu didésoxynébularine et ainsi à la formation d'une extrémité didésoxyribose en 5' de l'oligomère soit 3.

10



15

20



25

Celui-ci est mis en réaction avec l'amine désirée en présence de cyanoborohydrure de sodium en milieu tamponné. Les conditions expérimentales de cette étape dépendent de la nature de l'amine utilisée (solubilité, réactivité, ...) et l'oligomère fonctionnalisé 4 est isolé par CLHP.

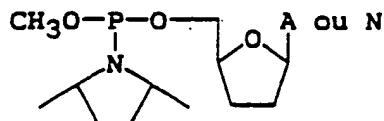
Selon une variante de réalisation, la réaction d'amination réductrice à l'étape c) du procédé selon l'invention, se fait par un traitement cyanoborohydrure de sodium en milieu acide.

30

Il apparaît que le dérivé phosphoramidite de didésoxynucléoside de nébularine s'hydrolysent plus aisément que tous les autres nucléosides pirymidiques ou puriniques en particulier que les nucléosides de l'adénine.

Les exemples ci-après décrivent la synthèse et la caractérisation des phosphoroamidites 5' de ddA et de ddN de type :

5



A = adénine

B = nébularine

10

Il est possible cependant d'utiliser d'autres dérivés phosphoroamidites protégés par divers autres groupements substituant le phosphore

CNCH₂CH₂ à la place de CH₃,

15



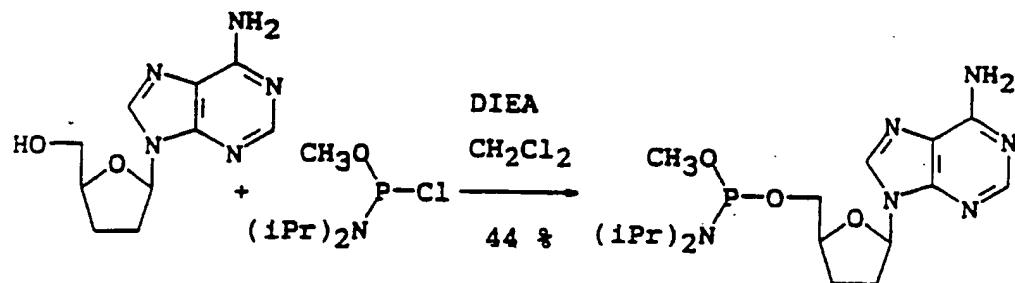
Est ensuite décrite l'utilisation de ces phosphoroamidites pour dérivatiser différents types d'oligodésoxynucléotides (béta ou alpha). L'amination réductrice par des effecteurs aminés du produit obtenu après dépurination sélective de la ddN 5' terminale, est décrite dans la mesure où cette succession d'étapes s'effectue sans isolement de oligomères intermédiaires.

25

EXEMPLE 2 :Synthèse du phosphoroamidite de la ddA :

5' -diisopropylaminométhoxyphosphinyl-2', 3' -didésoxyadénosine.

30



A une solution de 2', 3' -didésoxyadénosine (470,5 mg, 2 mmoles) dans du dichlorométhane anhydre (6ml) on ajoute de la N,N,N-diisopropyléthylamine (1,39 ml, 8 mmoles) et de la chloro N,N-diisopropylaminométhosyphosphine (0,98 ml, 5 mmoles). Le mélange est agité pendant 30 minutes à température ambiante, sous atmosphère d'argon, puis est versé dans une ampoule à décanter contenant de l'acétate d'éthyle (80 ml). La solution résultante est lavée avec de la saumure (4 x 50 ml). La phase organique est séchée sur sulfate de sodium, filtrée et évaporée à sec sous pression réduite. Le résidu obtenu est chromatographié sur colonne de gel de silice et l'élation a lieu avec des mélanges de cyclohexane, de dichlorométhane et de triéthylamine (90/9/l à 30/69/l, v/v/v). Les fractions contenant le produit désiré pur sont rassemblées, évaporées à sec et le résidu redissous dans du dioxane est soumis à lyophilisation. On obtient une poudre incolore (345,3 mg, 44 % Rdt).

15

- RMN ^{31}P (CD_3CN) 149,89 ppm.

20

- RMN ^1H (CD_3Cl_3) 8,33, 8,32 et 8,26 (3s, 2H, H_2 et H_8) ; 6,32 (m, 1H, $\text{H}_{1''}$) ; 4,34 (m, 1H, $\text{H}_{4''}$) ; 3,83 (m, 2H, $\text{H}_{5'}$ et $\text{H}_{5''}$) ; 3,58 (m, 2H, $\text{CH}(\text{iPr})_2$) ; 3,44 et 3,43 (2d, 3H, CH_3O) ; 2,50 (m, 2H, $\text{H}_{2'}$ et $\text{H}_{2''}$) ; 2,14 (m, 2H, H_3 , et $\text{H}_{3''}$) ; 1,16 (m, 12H, $\text{CH}_3(\text{iPr})_2$).

15

note : s = singulet, d = doublet, m = multiplet.

25

δ = déplacement chimique exprimé en ppm par rapport au signal du TMS.

- Spectre de masse :

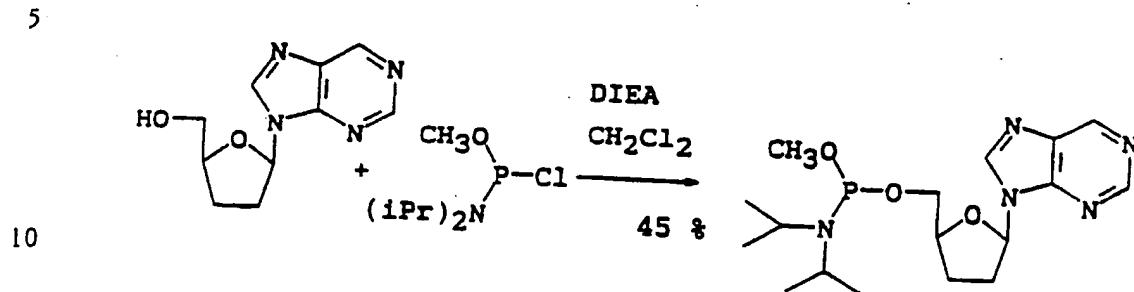
FAB < 0 ; matrice polyéthylèneglycol : $(\text{M}-\text{H})^- = 395$; $\text{B}^- = 134$; $\text{CH}_3\text{O}-\text{P}-(\text{O}^-)\text{N}(\text{iPr})_2 = 178$.

30

FAB > 0 ; matrice polyéthylèneglycol : $(\text{M}+\text{H})^+ = 397$; $(\text{M}+\text{H} - \text{HN}(\text{iPr})_2)^+ = 296$; $(\text{M}+\text{H} - \text{BH})^+ = 262$;

$(\text{M}+\text{H} - \text{CH}_3\text{O}-\text{P}(\text{OH})\text{N}(\text{iPr})_2)^+ = 218$; $\text{CH}_3\text{O}-\text{P}-\text{N}(\text{iPr})_2$ et $\text{B}-\overset{+}{\text{C}}\equiv\text{O} = 162$; $(\text{B}+\text{H}_2)^+ = 136$.

**EXEMPLE 3 :Synthèse du phosphoroamidite de la ddN : 5'-
-diisopropylaminométhoxyphosphinyl-2', 3'
-didéoxynébularine**



A une suspension de 2', 3' -didéoxynébularine (211,6 mg, 15 0,961 mmoles) dans du dichlorométhane anhydre (5 ml) on ajoute de la N, N, N-diisopropyléthylamine (0,67 ml, 3,844 mmoles) et de la chloro N,N-diisopropylaminométhoxyphosphine (0,35 ml, 1,8 mmoles). Le mélange est agité pendant 30 minutes à température ambiante, sous atmosphère d'argon, puis est versé dans une ampoule à décanter contenant de l'acétate d'éthyle (40 ml). La solution résultante est lavée avec de la saumure (4 x 25 ml). La phase organique est séchée sur sulfate de sodium, filtrée et évaporée à sec sous pression réduite. Le résidu obtenu est chromatographié sur colonne de gel de silice et dichlorométhane et de thriétylamine (90/9/1 à 50/49/1, v/v/v). Les fractions contenant le produit désiré pur sont rassemblées, évaporées à sec et le résidu redissous dans du benzène est soumis à lyophilisation. On obtient une poudre incolore (165,3 mg, 45 % Rdt).

20
25
30

- RMN ^{31}P (CD_3CN) 150,09 ppm.

- RMN ^1H (CD_3Cl_3) 9,03 (s, 1H, H₂ ou H₆ ou H₈) ; 8,88 (s, 1H, H₂ ou H₆ ou H₈) ; 8,59 et 8,55 (2s, 1H? H₂ ou H₆ ou H₈) ; 6,40 (m, 1H, H_{1'}) ; 4,32 (m, 1H, H_{4'}) ; 3,93-3,67 (m, 2H, H_{5'} et H_{5''}) ; 3,61-3,51 (m, 2H, CH(iPr)₂) ; 3,36 et 3,35 (2d, 3H, CH_3O , J_{HP} = 12,9 et 13,5 Hz) ; 2L,54 (m, 2H, H_{2'} et H_{2''}) ; 2,18 (m, 2H, H_{3'} et H_{3''}) ; 1,13 (m, 12H, CH₃(iPr)).

- Spectre de masse :

FAB < O ; matrice polyéthylèneglycol : $(M-H)^{-} = 380$;
 $B^{-} = 119$; $CH_3O-P(O^-)N(iPr)_2 = 178$.

5 FAB > O ; matrice polyéthylèneglycol : $(M+H)^{+} = 382$;
 $(M+H - HN(iPr)_2)^{+} = 281$; $(M+H - BH)^{+} = 262$;
 $(M+H - CH_3O-P(OH)N(iPr)_2)^{+} = 203$; $CH_3O-P-N(iPr)_2$ et $B-C\equiv O = 162$; $B-C\equiv O = 147$; $(B+H_2)^{+} = 121$.

10 **EXEMPLE 4** : Synthèse d'oligonucléotides comportant la didésoxynébularine à leur extrémité 5' sur support solide par la méthode au phosphoramidite.

15 La didésoxynébularine est incorporée au dernier stade de synthèse des oligonucléotides préparés à l'échelle d'une μ mole de façon classique selon les méthodes décrites dans la littérature (par exemple méthode au cyanoéthylphosphoroamidite pour les oligodésoxyribonucléotides de configuration bêta, méthode au méthylphosphoroamidite pour les oligodésoxyribonucléotides de configuration alpha : F. Morvan, B. Rayner, J.P. Leonetti et J.L. Imbach, Nucleic Acids Res., 16, 833-847, 1988).

20 25 Le cycle de couplage du synthon méthylphosphoroamidite de la ddN est celui utilisé en méthode au méthylphosphoroamidite (référence ci-dessus). A la fin de ce cycle, l'étape de détritylation est omise.

Déprotection des oligonucléotides :

Cette déprotection est tout à fait classique et dépend de la nature des groupements protecteurs des phosphates utilisés.

Ainsi, pour les oligonucléotides de configuration α la déprotection des phosphates est réalisée par une solution de thiophénol/-Et₃N/dioxane (1/1/2v/v/v) pendant 30 minutes à température ambiante, le décrochage de l'oligonucléotide sur le support est réalisé par un traitement avec NH₄OH 32 % pendant 3 fois 30 minutes à température ambiante et la déprotection des fonctions protégées par des groupements acyles (résultant

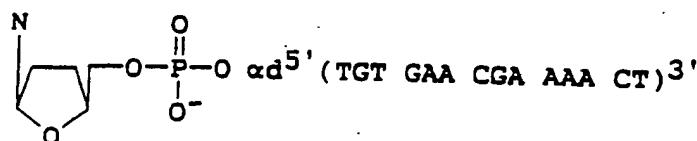
du capping) est effectuée par NH₄OH 32 % pendant 16 heures à 55°.

Pour les oligodésoxyribonucléotides de configuration , seul les traitements avec NH₄OH sont utilisés.

5

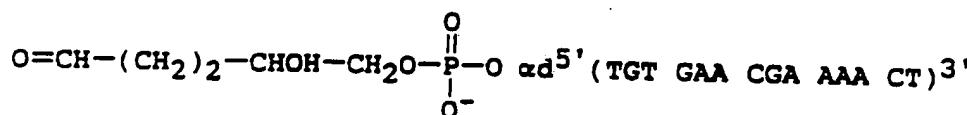
EXEMPLE 5 : Fonctionnalisation par l'amino-9 ellipticine à l'extrémité 5'OH d'un oligonucléotide dirigé contre l'extrémité "cap" du gène de la -globine de lapin.

10



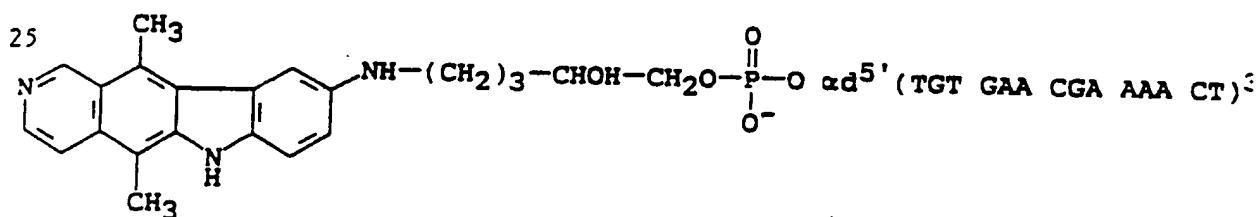
15

↓ HCl 30mM, 37°C, 14 min



20

↓ NaBH3CN, pH 5
amino-9 ellipticine



25

L'oligonucléotide (brut réactionnel obtenu après déprotection, 72 unités d'absorbance à 260 nm) comprenant à son extrémité 5' la didésoxynébularine est mis en solution d'acide chlorhydrique 100mM (300 µl). Le mélange est laissé à 37°C pendant 14 minutes. L'évolution de la réaction est suivie par CLHP dans les conditions décrites en annexe. On observe la disparition de l'oligonucléotide de départ (RT = 17,20 min, max

= 259,2 nm) et la formation λ max = 263,4 nm) et de l'oligonucléotide comportant à son extrémité 5' la chaîne OCH-(CH₂)₂-CHOH-CH₂O-P(O⁻)O₂ (R_T = 15,03 min, λ max = 259,2 nm).

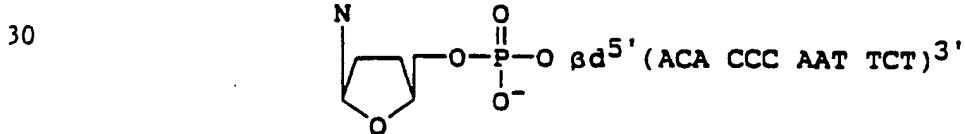
Au bout de ces 14 min de traitement acide, on ajoute 5 successivement une solution de cyanoborohydrure de sodium (6,2 mg, 100 μ moles) dans un tampon acétate de sodium 1M à pH 5 (400 μ l), de l'eau (500 μ l) puis une solution d'amino-9 ellipticine 10 nM dans l'acide chlorhydrique 20 mM. Le mélange réactionnel est laissé à température ambiante pendant 30 minutes. A ce stade, l'analyse CLHP du milieu réactionnel indique la disparition de l'oligonucléotide intermédiaire (R_T = 15,03 min) et la formation de l'oligonucléotide lié à l'aminoellipticine (R_T = 17,80 min, λ max = 259,2 nm et 307,2 nm). Ce dernier composé est alors purifié par CLHP.

La quantité obtenue d'oligonucléotide fonctionnalisé est de 29 15 unités d'absorbance à 260 nm. La pureté spectrophotométrique de ce composé est de 99 % à cette même longueur d'onde.

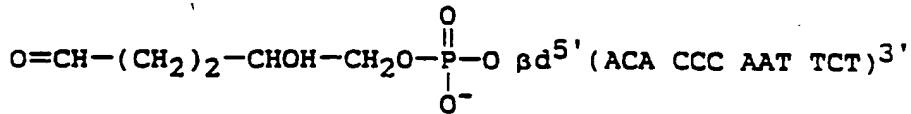
Conditions CLHP utilisées

injection : 10 μ l
 20 colonne Beckman XLODS C₁₈ 3 μ
 gradient linéaire d'une solution à 5 % d'acetonitrile dans un tampon acétate d'ammonium 0,1 M à pH 5,9 vers une solution à 15 % d'acetonitrile dans le même tampon en 30 min à un débit de 1 ml par min.

25 **EXEMPLE 6 :** Fonctionnalisation par l'amino-9 ellipticine à l'extrémité 5'OH d'un oligonucléotide β dirigé contre le site d'épissage du gène tat du virus HIV 1.



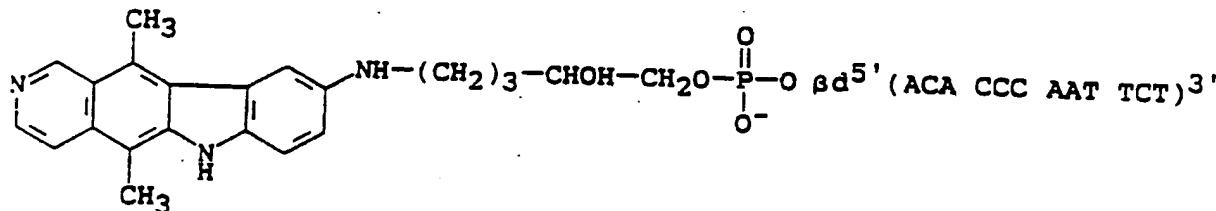
↓
HCl 30mM, 37°C, 12 min



5

↓
 NaBH₃CN, pH 5
 amino-9 ellipticine

10



15

L'oligonucléotide (brut réactionnel obtenu après déprotection, 80,5 unités d'absorbance à 260 nm) comprenant à son extrémité 5' la didésoxynébularine est mis en solution dans l'eau (700 µl). On ajoute alors une solution d'acide chlorhydrique 100 mM (300 µl). Le mélange est laissé à 37°C pendant 12 minutes. L'évolution de la réaction est suivie par CLHP dans les conditions décrites en annexe. On observe la disparition de l'oligonucléotide de départ (R_T 16,76 min, λ_{max} = 262,4 nm) et la formation concomitante de la base nébularine (R_T = 8,91 min, λ_{max} = 263,4 nm) et de l'oligonucléotide comportant à son extrémité 5' la chaîne $OCH-(CH_2)_2-CHOH-CH_2O-P(O^-)O_2-$ (R_T = 16,16 min, λ_{max} = 262,4 nm).

20

Au bout de ces 12 min de traitement acide, on ajoute successivement une solution de cyanoborohydrure de sodium (6,2 mg, 100 µmol) dans un tampon acétate de sodium 1M à pH 5 (400 µl), de l'eau 500 µl puis une solution d'amino-9 ellipticine 10 nM dans l'acide chlorhydrique 20 mM. Le mélange réactionnel est laissé à température ambiante pendant 30 minutes. A ce stade, une analyse CLHP du mélange réactionnel indique la disparition de l'oligonucléotide intermédiaire (R_T = 16,16 min) et la formation de l'oligonucléotide lié à l'aminoellipticine (R_T = 17,86 min, λ_{max} = 262,4 nm et 307,2 nm). Ce dernier composé est alors purifié par CLHP.

La quantité obtenue d'oligonucléotide fonctionnalisé est de 33 unités d'absorbance à 260 nm. La pureté spectrophotométrique de ce composé est de 94 % à cette même longueur d'onde.

5 Conditions CLHP utilisées

injection : 10 µl

colonne Beckman XLODS C₁₈ 3µ

gradient linéaire d'une solution tampon d'acétate d'ammonium 0,1 M à pH 5,9 vers une solution à 20 % d'acetonitrile dans le même tampon en 20 min à un débit de 1 ml par min.

15

20

25

30

REVENDICATIONS

1. Procédé de fonctionnalisation d'un oligonucléotide en son extrémité 5'OH par un agent effecteur aminé de formule RNH_2 caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes :

- 5 a) on synthétise ledit oligonucléotide
- b) on assemble sur l'extrémité 5'OH dudit oligonucléotide, un didésoxynucléotide via l'extrémité 5' de ce dernier,
- c) on effectue un couplage covalent dudit oligonucléotide avec 10 ledit réactif aminé RNH_2 par une réaction d'amination réductrice entre ledit réactif aminé et une fonction aldéhyde à l'extrémité 5'OH de l'oligonucléotide provenant de l'ouverture par hydrolyse acide du cycle glycosidique du didésoxynucléotide à l'extrémité 5'OH dudit oligonucléotide.

15

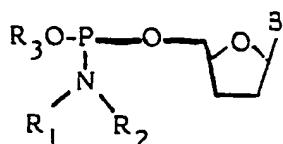
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'aux étapes a) et b), la synthèse de l'oligonucléotide est une synthèse d'assemblage au phosphoramidite sur support solide dans la dernière étape de laquelle, on utilise un dérivé phosphoramidite en 5' du didésoxynucléoside correspondant au didesoxynucleotide que l'on assemble par un cycle de synthèse supplémentaire à l'extrémité 5' dudit oligonucléotide.

25 3. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2 caractérisé en ce que après les étapes a) et b) et avant l'étape c) on décroche du support solide le composé constitué par ledit oligonucléotide à l'extrémité 5' duquel est assemblé le dit didésoxynucléotide et on élimine les groupes protecteurs.

30

4. Procédé selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que ledit dérivé phosphoramidite de didesoxynucleotide a pour formule :

5



(I)

formule dans laquelle

10

- R₁ et R₂ représentent un alkyl en C₁ à C₇ éventuellement substitué, tel que CH₃, CH-(CH₃)₂ ou R₁ + R₂ forment ensemble un groupe morpholino

15



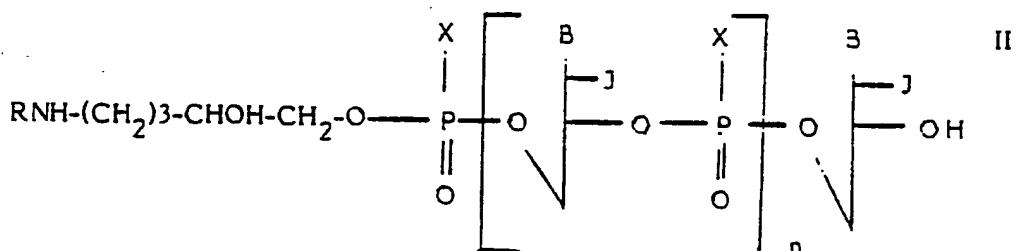
20 20

- R₃ représente un alkyl en C₁ à C₇ éventuellement substitué, notamment CH₃, ou CH₂-CH₂CN

- B représente une base d'acide nucléique notamment, l'adénine, la guanine ou la nébularine.

5. Procédé selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que l'oligonucléotide fonctionnalisé a pour formule :

25



30

formule dans laquelle :

- RNH est le reste monovalent de l'agent effecteur aminé RNH₂.
- J = H ou OH

- les radicaux B peuvent être identiques ou différents entre eux et représentent chacun une base d'un acide nucléique éventuellement modifiée attachée au cycle glycosidique selon une configuration anomérique alpha ou bêta,

- les radicaux X peuvent être identiques ou différents entre eux et représentent un oxoanion O^- , un thioanion S^- , un groupe alkyle, un groupe alcoxy, aryloxy, un groupe aminoalkyle, aminoalcoxy, thioalkyle,

10

- n est compris entre 1 et 50

15

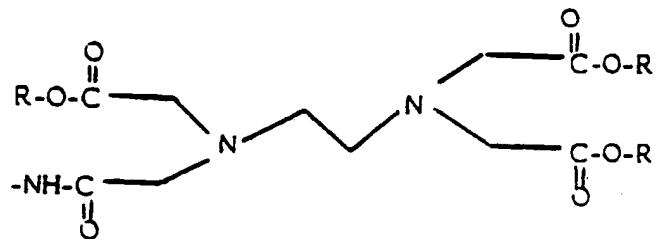
6. Procédé selon revendication 6 , procédé selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que $X = O^-$, S^- , ou CH_3 .

20

7. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que le reste RNH de l'agent effecteur représente :

25

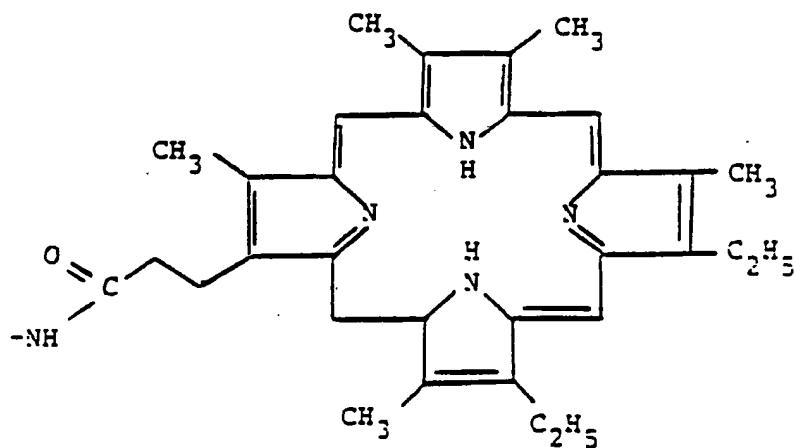
- les radicaux dérivés de l'acide éthylène-diamine-tétraacétique de formule :



25

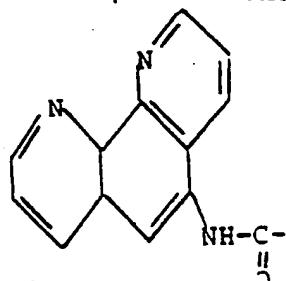
- les radicaux dérivés de l'acide d'éthylène-triamine-pentaacétique,
- les radicaux dérivés de la méthylpyrroporphyrine de formule :

30



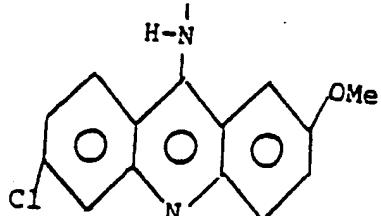
- les radicaux dérivés de la phénanthroliune de formule :

5



- les radicaux dérivés de l'acridine

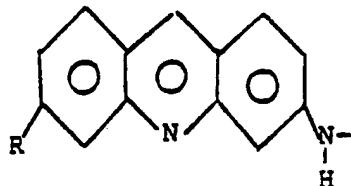
10



15

- les radicaux dérivés des la proflavine

20

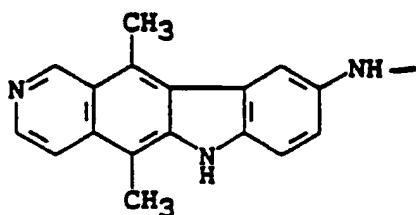


R représentant un groupement amino (NH_2) ou azido (N_3)

- la 9 amino ellipticine =

25

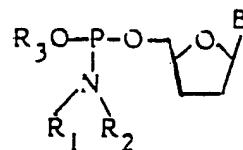
30



8. Procédé selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que la réaction d'amination réductrice à l'étape c) se fait par un traitement au cyanoborohydride de sodium en milieu acide.

9. Synthon utile dans un procédé selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce qu'il répond à la formule générale :

5



10 formule dans laquelle R₁, R₂, R₃ et B ont les significations données dans la revendication 4.

15

10. Synthon selon la revendication 9 caractérisé en ce que B représente l'adénine, la guanine ou la nébularine.

20

25

30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/FR 91/00503

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) *

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

Int.Cl.⁵ C 07 H 21/00

II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched ?

Classification System I	Classification Symbols
Int.Cl. ⁵	C 07 H 21/00
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched *	

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT*

Category	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	I Relevant to Claim No. 13
A	EP,A,0212546 (ENZO BIOCHEM INC.) 4 March 1987, see the whole document ---	1
A	WO,A,8605789 (BIOCARB AB) 9 October 1986, see pages 14-16 ---	1
A	WO,A,8600074 (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE) 3 January 1986, see the whole document ---	1

* Special categories of cited documents: ¹⁰

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"Z" document member of the same patent family

IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search

12 September 1991 (12.09.1991)

I Date of Mailing of this International Search Report

8 October 1991 (08.10.1991)

International Searching Authority

EUROPEAN PATENT OFFICE

I Signature of Authorized Officer

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO. FR 9100503
SA 48788

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 26/09/91. The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP-A- 0212546	04-03-87	AU-B-	596985	24-05-90
		AU-A-	6106486	19-02-87
		JP-A-	62055562	11-03-87
WO-A- 8605789	09-10-86	AU-A-	5668286	23-10-86
		EP-A-	0217912	15-04-87
WO-A- 8600074	03-01-86	FR-A-	2565996	20-12-85
		EP-A,B	0195009	24-09-86
		JP-T-	61502889	11-12-86

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 91/00503

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB
 Int.C1.5 C 07 H 21/00

II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée⁸

Système de classification	Symboles de classification
Int.C1.5	C 07 H 21/00

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté⁹

III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS¹⁰

Catégorie ¹¹	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire ¹² des passages pertinents ¹³	No. des revendications visées ¹⁴
A	EP,A,0212546 (ENZO BIOCHEM INC.) 4 mars 1987, voir le document en entier ---	1
A	WO,A,8605789 (BIOCARB AB) 9 octobre 1986, voir pages 14-16 ---	1
A	WO,A,8600074 (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE) 3 janvier 1986, voir le document en entier -----	1

¹¹ Catégories spéciales de documents cités:

- ^{"A"} document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- ^{"E"} document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- ^{"L"} document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- ^{"O"} document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- ^{"P"} document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- ^{"T"} document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- ^{"X"} document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive
- ^{"Y"} document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.
- ^{"&"} document qui fait partie de la même famille de brevets

IV. CERTIFICATION

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée
 12-09-1991

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

08.10.91

Administration chargée de la recherche internationale
 OFFICE EUROPÉEN DES BREVETS

Signature du fonctionnaire autorisé

Danielle van der Haas

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONAL
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9100503
SA 48788

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 26/09/91

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A- 0212546	04-03-87	AU-B- 596985 AU-A- 6106486 JP-A- 62055562	24-05-90 19-02-87 11-03-87
WO-A- 8605789	09-10-86	AU-A- 5668286 EP-A- 0217912	23-10-86 15-04-87
WO-A- 8600074	03-01-86	FR-A- 2565996 EP-A, B 0195009 JP-T- 61502889	20-12-85 24-09-86 11-12-86

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.